

マウス皮膚創傷治癒過程におけるNatural Killer T細胞の役割に関する研究

著者	丹野 寛大
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16847号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00096848

博士論文

マウス皮膚創傷治癒過程における
Natural Killer T 細胞の役割に関する研究

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座形成外科学分野

丹野寛大

目 次

I. 要約	3
II. 研究背景	5
III. 研究目的	7
IV. 研究方法	8
V. 研究結果	15
VI. 考察	20
VII. 結論	29
VIII. 謝辞	30
IX. 文献	31
X. 説明	39

I. 要約

【目 的】皮膚創傷治癒過程は炎症期、増殖期、再構築期から構成される連続したプロセスである。炎症期には白血球が創面に遊走し、生体防御機能において重要な役割を担う。増殖期には血管新生、筋線維芽細胞の分化による創収縮、再構築期にはコラーゲン合成が起こり、創が閉鎖し治癒へと至る。創傷治癒過程における白血球の役割について、これまでに抗体や遺伝子欠損マウスを用いた詳細な検討がなされているが、invariant Natural Killer T (iNKT) 細胞については、ほとんど検証されてこなかった。iNKT 細胞は T 細胞と NK 細胞の特性を併せもつ自然免疫リンパ球であり、皮膚疾患を含む様々な疾患の制御に深く関わり、活性化すると速やかに大量の IFN- γ 、IL-4 を産生することが報告されている。

本研究では、マウス創傷モデルを用いて創傷治癒過程における iNKT 細胞の役割に注目し解析を行った。

【方 法】WT マウス (C57BL/6) と iNKT 細胞欠損 Ja18KO マウスの背側皮膚に全層欠損創を作成し、閉鎖環境においた。創閉鎖率、肉芽組織の厚さ、再上皮化率、創部コラーゲン量、創部破断強度および、免疫染色により、筋線維芽細胞の指標として α -SMA、血管新生の指標として CD31 について解析を行った。皮膚ホモジネート上清を用いて、コラーゲン合成、血管新生に重要なサイトカインである TGF- β 1、VEGF 濃度を ELISA 法により測定した。Ja18KO マウスに WT もしくは IFN- γ KO マウス由来の iNKT 細胞を約 20% 含む細胞集団である肝臓単核細胞 (LMNC) を細胞移入し、その治癒過程について検討した。また、創部から mRNA を抽出し、IFN- γ 発現を

Real-time PCR で解析した。細胞内 IFN- γ 産生の解析にはフローサイトメトリーを用いた。また、iNKT 細胞の特異的活性化剤である α -galactosylceramide (α -GalCer) 投与による創傷治癒への影響を検討した。

【結 果】 iNKT 細胞を欠損した J α 18KO マウスでは、WT マウスと比較して、創閉鎖率、肉芽組織の厚さ、再上皮化率が有意に低下した。コラーゲン合成、 α -SMA 陽性細胞数、CD31 陽性細胞数、創部破断強度も同様に J α 18KO マウスで低下した。さらに、TGF- β 1、VEGF 産生も WT マウスに比べ、J α 18KO マウスで有意に低下した。J α 18KO マウスにおける創傷治癒過程の遅延は、WT マウス由来の LMNC 移入により完全に回復したが、J α 18KO、IFN- γ KO マウス由来の LMNC 移入では回復しなかった。創部 IFN- γ 発現は J α 18KO マウスにおいて創作成 6、12、24 時間で低下、創作成 3 日目では増加した。J α 18KO マウスでの創作成 3 日目における IFN- γ 産生細胞は好中球であった。 α -GalCer 投与により、WT マウスでは、創閉鎖率、コラーゲン合成の促進を認めたが、この促進効果は IFN- γ KO マウスでは誘導されなかった。

【結 論】 本研究により、iNKT 細胞が皮膚創傷治癒過程において促進的に関与することが明らかとなった。また、 α -GalCer を投与し、iNKT 細胞を活性化することにより創傷治癒が促進することが明らかとなった。この促進機構には iNKT 細胞から産生される IFN- γ が関与している可能性が示唆された。今回の結果より、iNKT 細胞を活性化することにより、治癒の促進が確認され、新しい創傷治療の標的となる可能性が示された。

II. 研究背景

皮膚創傷治癒過程は受傷直後から始まり、炎症期、増殖期、再構築期を経て治癒に至る。それぞれの過程で IL-1 β (interleukin-1 β ; インターロイキン 1 β)、IL-6、TNF- α (tumor necrosis factor- α ; 腫瘍壊死因子 α)、TGF- β (transforming growth factor- β ; トランスフォーミング成長因子 β)、EGF (epidermal growth factor; 上皮成長因子)、PDGF (platelet-derived growth factor; 血小板由来増殖因子)、VEGF (vascular endothelial growth factor; 血管内皮成長因子) などの様々なサイトカインや増殖因子が産生される¹⁻⁴⁾。炎症期には創部に好中球、マクロファージが集積し、皮膚に存在する微生物や組織障害により生じた壊死組織を貪食し、創部の清浄化や感染制御に働く。増殖期には肉芽組織形成、血管新生が起こり、リンパ球や線維芽細胞が重要な働きをすることが知られている⁵⁻⁷⁾。再構築期には、コラーゲン合成や再上皮化が起こり治癒へと至る。

創傷治癒過程における白血球の役割として、好中球、マクロファージについては詳細な解析がなされており、好中球は創傷治癒の遅延に関与することが報告されている^{8),9)}。また、マクロファージは創傷治癒過程に促進的に働くことが多数報告されている¹⁰⁻¹²⁾。しかし、創傷治癒に関するリンパ球の働きに関しては不明な点が多い。リンパ球には T 細胞、B 細胞の他に NK (Natural Killer; ナチュラルキラー) 細胞、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞など自然免疫リンパ球の存在が知られている。創傷治癒過程におけるリンパ球の役割として CD4、CD8 陽性 T 細胞はサイトカイン産生、白血球集積に関与するが創傷治癒には影響を与えないこと¹³⁾、B 細胞は表皮化や肉芽組織増殖を促進することが報告されている¹⁴⁾。また、NK 細胞は IFN- γ

(interferon- γ ; インターフェロン γ) 産生を介して創傷治癒を制御すること¹⁵⁾が報告されている。特に、 $\gamma\delta$ T 細胞の役割については多数報告されており、 $\gamma\delta$ T 細胞が様々なサイトカインを産生し、表皮化を促進することで創傷治癒に重要な役割を担うことが明らかとなっている¹⁶⁻²⁰⁾。一方、NKT 細胞に関しては、NKT 細胞が創傷治癒を遅延させることが、2011 年に Schneider らにより報告された^{21), 22)}。

自然免疫リンパ球である NKT 細胞は、T 細胞と NK 細胞の特性を併せ持つユニークな細胞であり、マウス NKT 細胞の中で最も主要なサブセットである invariant (*i*) NKT 細胞は V α 14-J α 18 によって構成される α 鎖と V β 8.2、V β 7、あるいは V β 2 によって構成される β 鎖によって構成される抗原受容体を持つ。*i*NKT 細胞は樹状細胞などの抗原提示細胞に発現している CD1d に結合した糖脂質抗原を認識し、活性化する。特に海綿から発見された糖脂質である α -GalCer (α -galactosylceramide ; α -ガラクトシルセラミド) を認識すると *i*NKT 細胞は速やかに活性化し、大量の IFN- γ 、IL-4 を産生する²³⁻²⁵⁾。この大量のサイトカイン産生能により、好中球、マクロファージ、樹状細胞などの活性化、ヘルパーT 細胞の分化誘導促進、さらに、アレルギー、自己免疫疾患、感染、腫瘍など様々な免疫に深く関与することが知られている²³⁻²⁸⁾。

前述の通り、Schneider らは、BALB/c 由来の *i*NKT 細胞欠損 (J α 18KO) マウスや NKT 細胞欠損 (CD1dKO) マウスを用い、これらのマウスでは、創傷治癒が促進することを報告している^{21), 22)}。しかし、*i*NKT 細胞が産生する IFN- γ 、IL-4 の影響や α -GalCer による *i*NKT 細胞活性化の影響について検討しておらず、*i*NKT 細胞がどのようなメカニズムで創傷治癒過程に関与するのかは明らかでない。本研究と Schneider らの研究との相違点を図 1A に示す。

Ⅲ. 研究目的

本研究では、*i*NKT細胞が皮膚創傷治癒過程にどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

IV. 研究方法

1. マウス

実験には、C57BL/6 マウス (CLEA Japan、Tokyo、Japan)、iNKT 細胞欠損マウス (J α 18KO マウス: 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学分野中山俊憲教授より供与)²⁹⁾、IFN- γ 欠損マウス (IFN- γ KO マウス: 東京理科大学生命医科学研究所実験動物学研究部門岩倉洋一郎教授より供与)³⁰⁾を 6–8 週齢で使用した。東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設において、SPF 環境下で飼育されたマウスを使用した。実験期間中、マウスの鎮痛を図るため、飲用水に 0.4 mg/マウス/日となるようにアセトアミドフェノール (Wako Pure Chemical、Osaka、Japan) を加えた。本研究のすべての実験は、「国立大学法人東北大学動物実験に関する規定」に準じ、東北大学環境安全委員会動物実験専門委員会の承認を得た上で実施した。(2013 医動-428、2013 医動-429、2015 医組換-052)

2. 創作成と組織採取

マウスは 70 mg/kg のペントバルビタール (Abbott Laboratory、North Chicago、IL、USA) を腹腔内投与し麻酔した上で、背側の体毛を除毛し、皮膚を完全に露出させ、70%エタノールで消毒後、皮膚生検用 3 mm パンチ (Biopsy Punch, Kai Industries Co., Ltd., Gifu, Japan) とハサミを用いて、マウス 1 匹につき 6 つの皮筋に達する全層欠損創をそれぞれ 5 mm 以上の間隔を保ち作成した。ポリウレタンフィルム (Tegaderm Transparent Dressing、3M Health Care、St. Paul、MN、USA) と弾性粘着包帯 (Hilate,

Iwatsuki, Tokyo, Japan) で閉鎖環境においた。組織を採取するときは、マウスを犠牲死させた後、皮膚生検用 8 mm パンチで創部を含めて採取した。

3. 試薬の投与

α -GalCer (Funakoshi, Tokyo, Japan) は、DMSO (dimethyl sulfoxide ; ジメチルスルホキシド) に溶解して 5 mg/mL とし、マウス投与時には 0.2%DMSO in PBS となるように PBS で希釈して使用した。創作成 1 日前に、創作成 5 日目に観察する場合には 3 日目にもマウスに腹腔内投与した (2 μ g/mouse)。対照群には溶媒の 0.2%DMSO を含む PBS を接種した。

4. 創面積測定

創面積の測定は、デジタルカメラ (CX4、RICOH、Tokyo, Japan) で撮影した画像を用いて行った。まず、創作成直後の創を 1 つずつ撮影した。各実験ポイントでマウスを犠牲死させた後、再度創を撮影した。撮影した画像は、画像解析ソフト Axio vision Release 4.6 (Carl Zeiss Micro Imaging, Jena, Germany) を使用し、創の辺縁をトレースすることによって創面積を測定し、創閉鎖率を計算した。

5. 創部組織中の白血球分離

マウス 1 匹当たり 6 個の創を作成し、創作成前、創作成後 6、12 時間、1、3 日後に 8 mm の皮膚生検用パンチで摘出した創 6 個中の白血球を分離した。各群 5 匹のマウスを用い、摘出した創を 10%FCS (fetal calf serum ; ウシ胎児血清) (Bio west, Nuaille、

France) と 1 mg/ mL dispase (Roche Diagonists, Tokyo, Japan)を加えた RPMI1640 培養液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と 4 °C で 16 時間インキュベートした。16 時間後、10 mM HEPES (Sigma-Aldrich)と 10%FCS、1 mg/mL collagenase (Sigma-Aldrich) と 1 mg/ mL hyaluronidase (Sigma-Aldrich) と 1 mg/ml DNase I (Roche Diagonists) を加えた RPMI1640 培養液とともに、37 °C で 2 時間震盪した。ホモジネート中の皮膚組織片を 70 μ m のナイロンメッシュ (BD Bioscience, Franklin lakes, NJ, USA) を通過させて除去した後、遠心し、1%FCS を加えた RPMI1640 で 3 回洗浄した。

6. フローサイトメトリー

皮膚から回収した白血球の Fc γ 受容体 (Fc γ R)をブロックする目的で、事前に 1%FCS・0.1%アジ化ナトリウム添加 PBS 中の細胞を抗 Fc γ R II・Fc γ R IIIモノクローナル抗体 (mAb) (clone 2.4G2) と氷上で 15 分間インキュベートした。2.4G2 抗体は、ハイブリドーマ細胞の培養上清から protein G column kit (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) を用いて精製した。その後、PE 標識抗 NK1.1 抗体 (clone PK136; eBioscience, San Diego, CA, USA) と APC 標識抗 CD3 抗体 (clone 145-2C11; Biolegend, San Diego, CA, USA)、eFluor® 450 標識抗 CD45 抗体 (clone 30-F11; eBioscience) で染色した。また、好中球の解析には PE 標識抗 CD11b 抗体 (clone M1/70; Biolegend) と FITC 標識抗 Gr-1 抗体 (clone RB6-8C5; Biolegend)で染色した。細胞内 IFN- γ の染色は以下の方法にて行った。細胞表面を染色した後に染色用緩衝液を用いて 2 回洗浄した。続いて、cytofix/cytoperm (BD Biosciences) を加えて培養した後、BD perm/wash 液 (BD Biosciences) で洗浄し、PE-Cy7 標識抗 IFN- γ 抗体 (clone XMG1.2;

Biolegend) またはアイソタイプコントロールラット IgG を用いて染色した。染色した細胞は、FACS Canto II (BD Bioscience) にて解析を行った。

白血球は CD45 陽性細胞で同定し、NK1.1 陽性 CD3 陰性細胞を NK 細胞、NK1.1 陽性 CD3 陽性細胞を NKT 細胞、NK1.1 陰性 CD3 陽性細胞を T 細胞、Gr-1 陽性 CD11b 強陽性細胞を好中球として解析した。

7. LMNC の採取・投与

LMNC の採取および投与は先行研究を参考にし行った^{31), 32)}。犠牲死させた WT マウス、J α 18KO マウス、IFN- γ KO マウスから肝臓を摘出し、200 μ m ステンレスメッシュ上で 2%FCS (BioWest) /5 mM HEPES (Sigma-Aldrich) 添加 RPMI1640 (Sigma-Aldrich) メディウムを加えながらホモジネートし、得られた細胞溶液を 35%Percoll (Pfizer, Inc., Täby, Sweden) を用いた比重遠心法 (2,000 回転/分、15 分、20 °C) により分離し、沈殿した LMNC を回収した。回収した LMNC を 10%FCS/RPMI で洗浄し、 1×10^6 /マウス/100 μ L となるように PBS で調整し、経静脈的にマウスに移入した。

8. RNA 抽出と定量リアルタイム PCR

総 RNA は Isogen (Wako Pure Chemical) を用いて創部皮膚組織全体より抽出し、PrimeScript[®] 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) により一本鎖 cDNA を合成した。定量リアルタイム PCR は遺伝子特異的プライマーおよび FastStart Essential DNA Green Master (Roche Applied Science, Branford, CT, USA) を用いて 20 μ L

の量に調製し、LightCycler[®] Nano System (Roche Applied Science) で測定した。使用したプライマー配列は COL1A1、Forward: 5'-AAG ACA AGG CAG CGG TGG AA-3'、Reverse: 5'-GCA GGG GAC AGG AAA TAG TT-3'、IFN- γ 、Forward: 5'-ACT GCC ACG GCA CAG TCA TT-3'、Reverse: 5'-TCA CCA TCC TTT TGC CAG TTC CT-3'、IL-4、Forward: 5'-ACG AGG TCA CAG GAG AAG GGA-3、Reverse: 5'-TTG GAA GCC CTA CAG ACG AGC-3、HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transferase; ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ)、Forward: 5'-GCT TCC TCC TCA GAC CGC TT -3、Reverse: 5'-TCG CTA ATC ACG ACG CTG GG-3 である。各プライマーの反応効率は標準曲線を作成することにより決定した。サンプル中のターゲット遺伝子とハウスキーピング遺伝子である HPRT の発現レベルは反応効率から算出した。得られた結果は相対定量法により解析し、HPRT 発現量との比較による相対的発現量として示した。

9. 創部ハイドロキシプロリン濃度測定

創摘出後、創を 2 mL の 6N 塩酸とホモジネートし、120 °C で 21 時間インキュベートし、回収した。回収後、サンプルを水酸化ナトリウムで中和した。スタンダードには、L-ハイドロキシプロリン (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を 100 $\mu\text{g/mL}$ に調整し、2 倍ずつ段階希釈し、最低濃度を 0.4 $\mu\text{g/mL}$ まで作成した。スタンダードと、中和したサンプルに 1 mL の 0.05 M クロラミン T (Nacalai Tesque) を加え、室温で 20 分間静置。3.15 M 過塩素酸 (Nacalai Tesque) を 1 mL 加え攪拌後、5 分間室温で静置した。その後、20% p-ジメチルアミノベンズアルデヒド (Nacalai Tesque) を 1 mL 加え

20 分間 60 °C でインキュベートし、Smart SpecTM3000 (Bio-Rad、Hercules、CA、USA) を用い吸光度 557 nm で測定した。

10. 病理組織学的解析

マウス1匹あたり6個の創を作成し、創部皮膚組織は8 mmの皮膚生検用のパンチ (Biopsy Punch, Kai Industries Co., Ltd.,) で摘出し、頭尾側方向に半切した後、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で24時間固定し、パラフィンに包埋した。半切した面から厚さ3 μ mの切片を作成し、HE (Hematoxyline-Eosin ; ヘマトキシリン・エオジン) 染色を施した。

免疫組織化学染色には、非特異的反応除去のため正常血清ヒストファインブロッキング試薬10% ウサギ正常血清 (Nichirei Bioscience、Tokyo、Japan) を反応させた後、各々別の切片を、抗CD31抗体 (Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA、USA) 、抗 α -SMA (α -smooth muscle actin) 抗体 (clone 1A4: DAKO、Tokyo、Japan) によって反応させた。対照の一次抗体としてコントロールIgG (IgG Dako Cytomation Negative Control Mouse IgG2a、DAKO) を用いた。

HE染色標本を用い、もとの創端部から上皮の伸展した距離を測定し、再上皮化率を算出、また肉芽組織の厚さを測定した。400倍の対物レンズ (Olympus BH-2, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、 α -SMA、CD31陽性細胞数をカウントした。抗 α -SMA染色標本では標本中の筋線維芽細胞を、抗CD31染色標本は創端部、創床部の左右計5視野 (1 mm²) 中からCD31陽性細胞をカウントし新生血管を評価した。

11. 創部破断強度の測定

WT マウスと J α 18KO マウスの創作成 7、10 日目の創部を 15 番のサージカルブレード (Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan) を用い、創の中心から 5 mm の場所から短冊状に摘出した (図 1B)。創部破断強度は IMS-001 (Keisei Medical Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、クリップで短軸方向を挟み、3 cm/min の速度で創部が破断するまで引き、創部が破断するのに必要な力 (g) を破断強度とした。

12. サイトカイン測定

皮膚ホモジネート上清中の TGF- β 1 濃度、VEGF 濃度を ELISA キット [eBioscience, San Diego, CA, USA (TGF- β 1)、R&D Minneapolis, MN, USA (VEGF)]を用いて測定した。測定における検出限界は TGF- β 1、VEGF とともに 8 pg/mL であった。

13. 統計解析

統計解析は JMP[®] Pro11 ソフトウェア (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan)を用いて行った。全ての数値データは平均 (mean) \pm 標準偏差 (SD: standard deviation)で示した。2 群間の有意差検定は Welch's t-test を用いて行った。3 群間以上の有意差検定は各実験群間の比較は Dunnett's method を用いて行った。p 値が 0.05 未満のとき、統計学的有意差ありとした。

V. 研究結果

1. 創部への NKT 細胞の集積および創傷治癒過程における *i*NKT 細胞の影響

皮膚損傷（創傷作成）により NKT 細胞が創部に集積するか否かを明確にするため、C57BL/6 (WT マウス) から皮膚白血球を回収し、フローサイトメトリーで解析を行った。正常皮膚組織 (unwounded) と創作成 3 日目のドットプロットを図 2A に示す。NKT 細胞の割合は正常皮膚組織 (unwounded) と比べ、創作成 24 時間、3 日目に有意に増加した (図 2B)。NKT 細胞数は創作成 6 時間後から徐々に増加し、創作成 3 日目では創傷を作成しない正常皮膚組織の約 10 倍に増加した (図 2C)。

次に、*i*NKT 細胞と創傷治癒との関係について、WT マウスと *i*NKT 細胞を欠損した *Jα18KO* マウスを用い比較検討を行った。WT マウスに比べ、*Jα18KO* マウスでは創作成 3、5 日目の創閉鎖率が有意に遅延したが、創作成 7、10 日目では差が認められなかった (図 3A、B)。病理組織学的解析により、肉芽組織の厚さ、再上皮化率の検討を行ったところ、肉芽組織の厚さは創作成 5、7 日目、再上皮化率は創作成 3、5、7 日目で WT マウスと比べ、*Jα18KO* マウスで有意に低下していた (図 3C、D、E)。以上の結果より、*i*NKT 細胞が創傷治癒の促進に関与していることが示された。

2. コラーゲン合成、創収縮、血管新生における *i*NKT 細胞の影響

創傷治癒に対する *i*NKT 細胞のより詳細な働きを明らかにするため、コラーゲン合成、創収縮、血管新生に関する解析を行った。肉芽組織形成に必須であり、皮膚組織に豊富に存在する I 型コラーゲンを Real-time PCR 法で検出したところ、COL1A1

(collagen type 1 α 1; I 型コラーゲン α 1) の mRNA 発現が創作成 3 日目において WT マウスと比べ、J α 18KO マウスで有意に低下していた (図 4A)。さらに、コラーゲン合成の指標としてコラーゲン特異的に存在するアミノ酸であるヒドロキシプロリンを測定した。創部ヒドロキシプロリン量は、WT マウス群と比較し、J α 18KO マウスにおいて創作成 3、5、7、10 日目で有意に低下していた (図 4B)。創部ヒドロキシプロリン量の差と一致して創部の破断強度も創作成 7、10 日目に J α 18KO マウスで有意な低下を認めた (図 4C)。また、創収縮に重要な筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA の発現および、血管新生の指標として血管内皮細胞のマーカー CD31 発現を免疫染色法にて評価した。 α -SMA 陽性細胞、CD31 陽性細胞ともに、WT マウス群と比較して、J α 18KO マウスにおいて創作成 3 日目に有意に低下していた (図 4D、E)。

3. TGF- β 1 および VEGF 産生における iNKT 細胞の影響

コラーゲン合成、創収縮 (筋線維芽細胞の分化)、血管新生に対する iNKT 細胞の関与が明らかになったことから、これらを促進するサイトカインである TGF- β 1、VEGF の産生について解析を行った。図 5A に示すとおり、WT マウスでは創作成 3 日目にかけて TGF- β 1 産生が増加したのに対し、J α 18KO マウスでは、ほとんど産生増加がみられず、創作成 1、2、3 日目に WT マウスと比較し、有意に少ない産生量を示した。また、VEGF は創作成 1 日目において J α 18KO マウスで有意に少ない産生量であった (図 5B)。

4. J α 18KO マウスに対する LMNC 移入の効果

次に、皮膚創傷治癒過程における iNKT 細胞の役割をより明確にするため、J α 18KO マウスに対して iNKT 細胞を約 20%程度含む LMNC を細胞移入し、創作成 3 日目の創閉鎖率、 α -SMA、CD31 発現について解析を行った。その結果、WT マウス由来の LMNC (iNKT 細胞を含む) を細胞移入された J α 18KO マウス群では創閉鎖率が WT マウス群並に回復したのに対し、iNKT 細胞を欠損した J α 18KO マウス由来の LMNC (iNKT 細胞を含まない) を細胞移入された J α 18KO マウス群では創閉鎖率の回復はみられなかった (図 6A)。また、 α -SMA、CD31 陽性細胞数についても同様に、WT マウス由来の LMNC を細胞移入された J α 18KO マウス群で WT マウス群と同程度まで陽性細胞数が回復したのに対し、J α 18KO マウス由来の LMNC を細胞移入された J α 18KO マウス群ではそのような効果は得られなかった (図 6B、C)。

5. IFN- γ 、IL-4 産生における iNKT 細胞の影響

次に、創部における IFN- γ 、IL-4 産生について検討した。WT マウスでは創作成 12 時間をピークに IFN- γ 発現が増加したのに対し、J α 18KO マウスでは、ほとんど変化せずに経過していた。ところが、創作成 3 日目において J α 18KO マウスでは劇的に IFN- γ mRNA 発現の増加を認めた (図 7A)。そこで、創作成 3 日目における J α 18KO マウス皮膚組織中の IFN- γ 産生細胞の解析を行った。IFN- γ 産生細胞は、NK 細胞、T 細胞ではなく、好中球であった (図 7B)。一方、IL-4 mRNA は、全てのタイムポイントで検出できなかった。

6. 創傷治癒過程における *i*NKT 細胞由来 IFN- γ の影響

J α 18KO マウスにおいて早期の IFN- γ 産生が低下していたことから、*i*NKT 細胞由来の IFN- γ が創傷治癒に与える影響を解析した。J α 18KO マウスに WT マウスと IFN- γ KO マウス由来の LMNC を各々移入したところ、図 7C に示すように J α 18KO マウスで低下していた創閉鎖率が WT マウス由来の LMNC の移入により回復したのに対し、IFN- γ KO マウス由来の LMNC を移入された J α 18KO マウスではそのような効果は認められなかった。 α -SMA 陽性細胞数及び、CD31 陽性細胞数についても同様の結果であった (図 7D、E)。

7. α -GalCer 投与による *i*NKT 細胞活性化が創傷治癒過程に与える影響

*i*NKT 細胞欠損マウスにおける創傷治癒遅延が示されたことから、次に、*i*NKT 細胞を特異的に活性化する α -GalCer 投与が創傷治癒に与える影響について解析を行った。創作成前日、 α -GalCer をマウス腹腔内に投与することにより、コントロール投与群に比べ、創作成 3 日目の創閉鎖率が促進した (図 8A)。同様に、創部ハイドロキシプロリン量、血管新生の指標である CD31 陽性細胞数も創作成 3 日目にコントロール投与群と比較し、 α -GalCer 投与群で有意な増加を認めた (図 8B、E)。一方、TGF- β 1 産生、 α -SMA 陽性細胞数、VEGF 産生は両群間に有意な差は認められなかった (図 8C、D、F)。

さらに、 α -GalCer 投与による IFN- γ 発現の推移、 α -GalCer による治癒促進における IFN- γ の影響を明確にするため、創部 IFN- γ mRNA 発現、IFN- γ KO マウスにおける

α -GalCer 投与の影響について解析を行った。創部 IFN- γ mRNA 発現は創作成 6、12 時間後に α -GalCer 投与群で有意に増加した (図 8G)。IFN- γ KO マウスでは、 α -GalCer 投与による創閉鎖促進効果は認められなかった (図 8H)。

VI. 考察

今回の研究により、以下のことが明らかとなった。1) 創作成後、創部皮膚組織への NKT 細胞の集積を認めた。2) WT マウスと比較し、*i*NKT 細胞を欠損した J α 18KO マウスでは創閉鎖率、肉芽組織の厚さ、再上皮化率の低下を認めた。3) 創傷治癒を評価する指標である創部ハイドロキシプロリン量、COL1A1 mRNA、 α -SMA、CD31 発現、創部破断強度が J α 18KO マウスでは有意に低下した。4) コラーゲン合成、創収縮 (筋線維芽細胞の分化)、血管新生に関与する TGF- β 1、VEGF 産生が J α 18KO マウスで有意に低下した。5) 創作成後早期の創部 IFN- γ 産生は J α 18KO マウスでは低い産生量を示したが、創作成 3 日目で急激に増加した。6) J α 18KO マウスにおける創傷治癒遅延は WT マウス由来の LMNC を J α 18KO マウスに細胞移入することで、完全に回復したが、J α 18KO、IFN- γ KO マウス由来の LMNC では回復しなかった。7) WT マウスでは、*i*NKT 細胞を活性化する α -GalCer を投与することにより創傷治癒が促進したが、IFN- γ KO マウスでは促進効果は認められなかった。

本研究は、*i*NKT 細胞が創部でのコラーゲン合成、創収縮 (筋線維芽細胞数の増加) を促進し、創傷治癒過程を促進することを初めて明らかにした。TGF- β はマクロファージから産生され、線維芽細胞を筋線維芽細胞に分化させることや、筋線維芽細胞からのコラーゲン合成を増加させ、肉芽組織形成や創閉鎖を促進する重要なサイトカインであることが知られている³³⁻³⁵⁾。本研究では、J α 18KO マウスにおける TGF- β 1 産生の低下を認めた。この結果から、*i*NKT 細胞の欠損により、TGF- β 1 産生が低下し、コラーゲン合成、筋線維芽細胞数の減少につながったと考える。同様の結果が、肝障

害モデルを用いて検証されており、WT マウスと比較し CD1dKO (NKT 細胞欠損) マウスにおける COL1A1、 α -SMA、TGF- β 1 mRNA 発現の減少が報告されている³⁶⁾。また、創傷治癒過程において血管新生も非常に重要な治癒のプロセスであり、血管新生には VEGF が必要不可欠である³⁷⁾。iNKT 細胞と血管新生の関係は、Hijioka らにより、目の脈絡膜の血管新生を観察したモデルにおいて、J α 18KO マウス、CD1dKO マウスで VEGF 発現が低下し、血管新生が減少することが報告されている³⁸⁾。本研究でも同様に、VEGF 産生、CD31 陽性細胞が J α 18KO マウスで減少していた。しかし、VEGF 産生は創作成 1 日目において J α 18KO マウスで減少しており、創作成 2、3 日目では有意差は認められなかった。そのため、iNKT 細胞による血管新生の促進は一時的なものであり、創作成 3 日目以降は血管新生促進に関与するかは不明である。血管新生を促進する因子としては、VEGF 以外に TGF- β ³⁹⁾、HGF (hepatocyte growth factor ; 肝細胞増殖因子)⁴⁰⁾などの因子も知られており、これらの成長因子によって、血管新生が促進した可能性も考えられる。また、iNKT 細胞が直接 VEGF を産生するかは不明であり、今後 iNKT 細胞と創傷治癒過程において VEGF を産生する細胞との関係についても検討が必要である。創傷治癒過程において、TGF- β 、VEGF は主にマクロファージや線維芽細胞から産生されるサイトカインである^{4),33)}。これらの結果は、iNKT 細胞がマクロファージや線維芽細胞からの TGF- β 、VEGF 産生を誘導し、コラーゲン合成、筋線維芽細胞分化、血管新生を促進している可能性を示唆していると考ええる。

また、本研究では、iNKT 細胞を豊富に含む細胞集団 LMNC を J α 18KO マウスに細胞移入する実験により、皮膚創傷治癒過程における iNKT 細胞の関与をより明確にした。J α 18KO マウスに WT マウス由来の LMNC を移入することにより、創閉鎖の遅延、

α -SMA、CD31 陽性細胞数の低下が回復した。一方、*i*NKT 細胞を欠損した *Ja18KO* マウス由来の LMNC 移入ではその回復効果は得られなかった。このことから、*i*NKT 細胞が創閉鎖、筋線維芽細胞分化、血管新生に関与することがより明確に示されたと考える。本研究では LMNC の移入により、*i*NKT 細胞が *Ja18KO* マウスの創部に集積するか、創部で IFN- γ を産生するか否か検討していないため、移入された *i*NKT 細胞がどの臓器に定着したか明らかでない。しかし、2011 年に Wong らは脳梗塞後に肝 *i*NKT 細胞が IL-10 を産生し、免疫抑制に関与することを報告していることから⁴¹⁾、移入された *i*NKT 細胞が、創部に集積するのではなく、肝臓や他の臓器に定着し、IFN- γ などサイトカイン産生を介し、作用している可能性も考えられる。今後 GFP トランスジェニックマウスやコンジェニックマウスを用い細胞移入後の *i*NKT 細胞分布を明らかにしていく。

さらに、本研究では、*i*NKT 細胞が産生するサイトカインである IFN- γ に注目し解析を行った。創傷治癒過程において IFN- γ の役割は、プラスとマイナスの両面が報告されている。TNF- α と IFN- γ で刺激した単球/マクロファージを創部に投与することにより、糖尿病ラットでの創傷治癒遅延の回復、単球/マクロファージからの VEGF 産生と食食能が増強することが報告されている⁴²⁾。一方、Ishida らは IFN- γ が TGF- β 産生を抑制し、創傷治癒の遅延に働くことを報告している⁴³⁾。本研究では、受傷後早期の IFN- γ 発現が WT マウスに比べ、*Ja18KO* マウスで有意に低下し、*i*NKT 細胞が早期に IFN- γ を産生し、創傷治癒促進に関与している可能性を示した。この知見と一致して、IFN- γ 産生能を有する WT マウス由来の LMNC 移入により、*Ja18KO* マウスで低下していた創閉鎖率、筋線維芽細胞分化、血管新生の回復がみられたが、IFN- γ 産生

能を欠損した IFN- γ KO マウス由来の LMNC では回復しなかった。LMNC には、NKT 細胞だけでなく、NK 細胞や T 細胞、B 細胞が含まれており、これらの細胞も NKT 細胞と同様に IFN- γ を産生する。しかし、図 5 で示したように、J α 18KO マウス由来の LMNC (NK 細胞、T 細胞からの IFN- γ 産生能を有する) では創傷治癒遅延が回復しないことや、J α 18KO マウスでは早期の IFN- γ 産生が低いことから、NKT 細胞から産生される IFN- γ が創傷治癒促進に関与すると考える。しかし、J α 18KO マウスでは iNKT 細胞が欠損することにより、LMNC 中のリンパ球分布が変化している可能性が考えられる。LMNC 中に存在するリンパ球である NK 細胞は創傷治癒を制御すること¹⁵⁾、CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞は創傷治癒に関与しないことや¹³⁾、B 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞は創傷治癒を促進することが報告されているが^{14), 16-20)}、これらの細胞が創傷治癒を遅延させている可能性を否定することは難しい。今後は、セルソーターや磁気細胞分離法を用いて分離した iNKT 細胞単独の移入や iNKT 細胞を除去した WT マウス由来 LMNC を J α 18KO マウスに移入することによりこの点を明確にする必要がある。

また、治癒過程の増殖期 (3 日目) における IFN- γ 発現が WT マウスに比べ、J α 18KO マウスで有意に増加しており、IFN- γ の役割が創傷治癒過程の早期と後期で異なる可能性が考えられた。IFN- γ は早期ではマクロファージの貪食能や VEGF 産生を増加させることにより創傷治癒を促進するが、後期では TGF- β 産生を抑制し、創傷治癒を阻害する可能性が考えられた。従って、治癒過程の増殖期 (3 日目) にみられた J α 18KO マウスの急激な IFN- γ 産生の増加は、コラーゲン合成や創部破断強度の低下を誘導したと考える。しかし、本研究で得られた IFN- γ の知見は、Ishida らの報告⁴³⁾とは相反するものとなった。iNKT 細胞は IFN- γ 、IL-4 以外にも IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IL-17A

や TNF- α など様々なサイトカインを産生することが知られている⁴⁴⁾。そのため、IFN- γ 以外のサイトカインが創傷治癒促進に関与している可能性、もしくは IFN- γ と他のサイトカインが協調して働く可能性が考えられる。IFN- γ は IL-1 α 、IL-1 β や TNF- α と協調し、*in vitro* 刺激において線維芽細胞からの VEGF や HGF 産生を促進することも報告されているため^{45), 46)}、今後、他のサイトカインとのバランスなども含めて解析していく。

今回私は、*i*NKT 細胞欠損の影響に加え、*i*NKT 細胞を活性化させる α -GalCer 投与による創傷治癒過程への影響についても解析を行った。 α -GalCer 投与により、創閉鎖、コラーゲン合成、CD31 陽性細胞、IFN- γ 産生を促進した。しかし、TGF- β 1、VEGF 産生、 α -SMA 陽性細胞数は α -GalCer 投与による変化を認めなかった。これまでに、IFN- γ が TGF- β 産生、筋線維芽細胞分化の抑制に作用することが明らかになっており⁴⁷⁻⁴⁹⁾、 α -GalCer により活性化された *i*NKT 細胞からの過剰な IFN- γ 産生が TGF- β や α -SMA 陽性細胞の増加を阻害した可能性がある。また、IFN- γ の作用として好中球集積、アポトーシスを制御することやマクロファージの貪食能を増強することなどが知られている^{50), 51)}。創傷治癒過程において好中球は治癒遅延に働き、マクロファージは促進に働くと報告されている⁸⁻¹²⁾。緑膿菌肺感染モデルでは α -GalCer 投与により、好中球集積低下および IFN- γ 産生によるマクロファージの貪食能増強が報告されている⁵²⁾。さらに、肝炎モデルでは α -GalCer 投与により産生された IFN- γ が好中球のアポトーシスを促進することが報告されている⁵³⁾。これらの報告より、創傷治癒過程において、 α -GalCer 投与により産生された IFN- γ は創傷遅延に働く好中球集積の低下およびマクロファージの貪食能を増強し、異物の除去を促進することにより、創傷治癒促

進に関与したと考える。また、IFN- γ KO マウスへの α -GalCer 投与では創閉鎖の促進効果を認めなかったことから、 α -GalCer による創傷治癒促進には IFN- γ の重要性が示唆されるが、0.2%DMSO を投与した WT マウスと IFN- γ KO マウス間に有意な差は認められなかった。このことは創傷治癒過程において IFN- γ が重要ではない可能性を示唆するが、前述の通り、創傷治癒過程における IFN- γ の役割は、プラスとマイナスの両面が報告されており^{42), 43)}、その役割は議論の余地があると考ええる。また、IFN- γ が欠損することにより、代償的に他のサイトカイン産生が増加している可能性もあるため、抗 IFN- γ 抗体投与の影響についても解析することで、より詳細に明らかにする必要があると考える。 α -GalCer 投与により、全ての創傷治癒の指標を促進することが出来なかった理由は現時点では不明であるが、本研究により、 α -GalCer によって活性化された iNKT 細胞が様々なサイトカインの産生に寄与している可能性があると考ええる。また、iNKT 細胞は α -GalCer などの抗原を認識し、活性化すると NK 細胞受容体や T 細胞受容体発現が低下し、検出が困難になることが報告されている⁵⁴⁾。そのため、本研究において iNKT 細胞が創部に集積したかは明らかに出来ていないが、上記の理由により検出感度が低下したと考える。 α -GalCer は腹腔投与後、早期に血清中で IFN- γ などのサイトカイン産生を誘導する⁵⁵⁾ことが知られており、サイトカイン産生を通して間接的に創傷治癒促進に作用した可能性や、 α -GalCer が血中を循環し、皮膚に存在する iNKT 細胞を直接的に活性化し、皮膚創傷治癒を促進した可能性が考えられる。

皮膚創傷治癒に関する NKT 細胞の役割に関する研究は、WT マウスに比べ、J α 18KO マウス、CD1dKO マウスや抗 CD1d 抗体投与マウスで創閉鎖、コラーゲン合成、TGF- β 産生が促進したという Schneider らの報告に限られる^{21), 22)}。本研究は、この報告と相

反する結果を示し、J α 18KO マウスで創閉鎖が遅延し、コラーゲン合成の低下を認めた。この結果の相違は、マウスのストレインの違い（本研究では C57BL/6 マウス、Schneider らは BALB/c マウスを用いている）や創部の環境（本研究では閉鎖創、Schneider らは開放創）によるものと考ええる。一般的に BALB/c マウスは Th2 反応が優位なマウスであり、逆に、C57BL/6 マウスは Th1 反応が優位なマウスである⁵⁶⁻⁵⁸。さらに、2015 年に Benoit らは、肺への緑膿菌感染時に、C57BL/6 由来の CD1dKO マウスと BALB/c 由来の CD1d KO マウスでは産生するサイトカインが異なることを報告している⁵⁹。これらの報告からも、同じ J α 18KO マウスに創を作成した場合においても、ストレインの違いにより、免疫反応が異なり、この相反する結果になった可能性がある。また、Schneider らは、J α 18KO マウスのみならず、CD1d KO マウスも用い、創傷治癒への影響を解析している。NKT 細胞は大きく、iNKT 細胞と Type II NKT 細胞に分類される^{60, 61}。J α 18KO マウスは iNKT 細胞のみを欠損したマウスであり²⁹、CD1d KO マウスは iNKT 細胞と Type II NKT 細胞両方を欠損したマウスである^{62, 63}。iNKT 細胞と Type II NKT 細胞の違いは、iNKT 細胞が α -GalCer や内因性抗原 iGb3 により活性化するのに対し^{50, 64}、Type II NKT 細胞は中枢神経系に多く含まれる内因性抗原 Sulfatide を認識し、活性化することが挙げられる^{65, 66}。また、iNKT 細胞は、創部感染の原因菌として知られる緑膿菌などの LPS のような PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns ; 病原体関連分子パターンズ) や死細胞から放出される high mobility group box-1 のような DAMPs (Damage-associated molecular patterns ; ダメージ関連分子パターンズ) を認識した抗原提示細胞から産生されるサイトカインによって活性化することが報告されている⁶⁷⁻⁶⁹。本研究は、J α 18KO マウス

や α -GalCer 投与の影響を解析した *i*NKT 細胞に特化した研究であるが、Schneider らは Type II NKT 細胞の影響も含め解析を行っている。より詳細なメカニズムを明らかにするために、創傷治癒過程における *i*NKT 細胞と Type II NKT 細胞のそれぞれの役割についても検討が必要である。また、創作成後 *i*NKT 細胞が活性化し、IFN- γ を産生する機序については、本研究では明らかに出来ていないが、創作成後の内因性抗原 (iGb3) 動態および、創作成後の DMAPs 特に、創傷治癒を促進することが既に報告されている high mobility group box-1⁷⁰⁾ が、創部における *i*NKT 細胞活性化に関与する可能性にも注目し、今後さらに解析が必要である。

本研究の限界として、NKT 細胞を NK1.1 と CD3 で検出している点、WT マウスでの早期の IFN- γ 産生細胞を同定していない点、集積した NKT 細胞のソースが不明な点が挙げられる。フローサイトメトリーを用いて *i*NKT 細胞のみを検出するためには、 α -GalCer/CD1d tetramer と CD3 (または TCR β) の組み合わせで染色しなくてはならないが、本研究では NK1.1 と CD3 で染色しているため、Type II NKT 細胞も含めた解析となっている。NK1.1 と CD3 の組み合わせでは、*i*NKT 細胞を欠損した *J α 18KO* マウスの LMNC においても 5~10%程度 NKT 細胞が検出されることが報告されている (Type II NKT 細胞が 5~10%存在している)^{71, 72)}。そのため、本研究で皮膚に集積した *i*NKT 細胞の割合、実数を正確には明らかに出来ていない。また、WT マウスでの受傷後早期の IFN- γ の産生細胞は *J α 18KO* マウスでは早期の産生がみられなかったことから、*i*NKT 細胞であると考えているが、早期では、NKT 細胞数が 100 個もなく、細胞内染色で検出することが困難であった。さらに、皮膚に集積してくる NKT 細胞がどこから集積してくるのかも明らかに出来なかった。これらは今後の検討課題である

が、 α -GalCer/CD1d tetramer の入手、皮膚白血球採取法の検討、また、NKT 細胞は肝臓、脾臓、骨髄に多い細胞であるため⁵⁰⁾ 今後これらの臓器にも注目し、更なる研究を行っていく。

本研究により得られた結果と、文献より NKT 細胞による創傷治癒促進機構の仮説を図 9 に示す。受傷直後の炎症期に、NKT 細胞が創部に集積し、IFN- γ を産生する。次の増殖期において、IFN- γ により活性化したマクロファージや線維芽細胞より TGF- β 、VEGF が産生され、筋線維芽細胞分化および血管新生が促進する。再構築期では分化した筋線維芽細胞がコラーゲンを合成し、創閉鎖が促進し、最後に再上皮化が起こり、治癒へと至ると考える。

VII. 結論

本研究は、創傷治癒過程において *i*NKT 細胞が促進的に関与していることを証明した最初の報告である。本研究結果から、*i*NKT 細胞が TGF- β や VEGF 産生誘導を介して、創閉鎖、コラーゲン合成、筋線維芽細胞分化、血管新生を促進し、このメカニズムには IFN- γ が必要である可能性が明らかとなった。また、 α -GalCer 投与により *i*NKT 細胞を活性化することにより、創傷治癒が促進することが明らかとなった。本研究により、*i*NKT 細胞を標的とした創傷の新たな治療法を開発する上で有用な基盤的情報が得られたと考える。

VIII. 謝辞

東北大学大学院医学系研究科形成外科学分野の館正弘教授、感染分子病態解析学分野の川上和義教授、石井恵子准教授には、研究に必要な知識・技術の基礎から応用、研究に対する姿勢まで幅広くご指導頂きました。心より感謝申し上げます。東北大学大学院医学系研究科形成外科学分野、感染分子病態解析学分野の皆様から多くのご協力を頂きました。また、J α 18KO マウスをご供与下さった、千葉大学大学院医学研究院免疫発生学分野中山俊憲教授、IFN- γ KO マウスをご供与下さった、東京理科大学生命医科学研究所実験動物学研究部門岩倉洋一郎教授に深謝いたします。実験動物病理プラットフォームの伊達文子氏からは、実験の基本的な手技、病理標本の作製を指導していただきました。また、看護アセスメント学分野の丸山良子教授にはご配慮、ご支援を頂きました。さらに、私を研究の世界へと導いて下さった看護アセスメント学分野の菅野恵美講師には深く御礼申し上げます。これまでに多くの方々のお力添えを賜り、ここに本研究の完成を迎えることができました。ここを出発点として今後も研究に邁進して参る所存です。

IX. 参考文献

1. Robson MC, Steed DL, Franz MG: Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 2001; 38:A1–A140.
2. Rumalla VKMD, Borah GLMD: Cytokines, Growth Factors, and Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg* 2001; 108:719–733.
3. Mast BA, Schultz GS: Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1996; 4:411–420.
4. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al: PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; 16:585–601.
5. Dovi JV, Szpaderska AM, DiPietro LA: Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury?. *Thromb Haemost* 2004; 92:275-280.
6. Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, et al: Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 2011; 216:753-762.
7. Singer AJ, Clark RA: Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341:738-746.
8. Dovi JV, He LK, DiPietro LA: Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol* 2003; 73:448-455.
9. Wetzler C, Kampfner H, Stallmeyer B, et al: Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol* 2000; 115:245–253.

10. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ: Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol* 2009; 175: 2454–2462.
11. Khanna S, Biswas S, Shang Y et al: Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS One* 2010; 5: e9539.
12. Novak ML, Koh TJ: Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol* 2013; 93: 875-881.
13. Chen L, Mehta ND, Zhao Y, et al: Absence of CD4 or CD8 lymphocytes changes infiltration of inflammatory cells and profiles of cytokine expression in skin wounds, but does not impair healing. *Exp Dermatol* 2014; 23:189–194.
14. Iwata Y, Yoshizaki A, Komura K, et al: CD19, a response regulator of B lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced TLR4 signaling. *Am J Pathol* 2009; 175:649-660.
15. Jussi Liippo, Mervi Toriseva, Veli-Matti Kahari: Natural killer cells in wound healing. *Natural Killer Cells Basic Science and Clinical Application* 2010; 39:519-525.
16. Jameson J, Ugarte K, Chen N, et al: A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 2002; 296:747-749.
17. Jameson JM, Cauvi G, Sharp LL, et al: $\gamma\delta$ T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J Exp Med* 2005; 201:1269–1279.
18. Toulon A, Breton L, Taylor KR, et al: A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med* 2009; 206:743–750.
19. MacLeod AS, Hemmers S, Garijo O, et al: Dendritic epidermal T cells regulate skin antimicrobial barrier function. *J Clin Invest* 2013; 123:4364-4374.

20. Havran WL, Jameson JM: Epidermal T cells and wound healing. *J Immunol* 2010; 184:5423-5428.
21. Schneider DF, Palmer JL, Tulley JM, et al: A Novel Role for NKT Cells in Cutaneous Wound Repair. *J Surg Res* 2011; 168:325–333.
22. Schneider DF, Palmer JL, Tulley JM, et al: Prevention of NKT Cell Activation Accelerates Cutaneous Wound Closure and Alters Local Inflammatory Signals. *J Surg Res* 2011; 171:361–373.
23. Godfrey DI, Hammond KJL, Poulton LD, et al: NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000; 21:573–583.
24. Kronenberg M, Gapin L: The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:557–568.
25. Taniguchi M, Harada M, Kojo S, et al: THE REGULATORY ROLE OF V α 14 NKT CELLS IN INNATE AND ACQUIRED IMMUNE RESPONSE. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:483–513.
26. Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M: The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:405–417.
27. Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, et al: Monocyte Chemoattractant Protein-1-Dependent Increase of V α 14 NKT Cells in Lungs and Their Roles in Th1 Response and Host Defense in Cryptococcal Infection. *J Immunol* 2001; 167:6525–6532.
28. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, et al: Critical role of V α 14⁺ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol* 2003; 33:3322–3330.

29. Cui J, Shin T, Kawano T, et al: Requirement for V α 14 NKT Cells in IL-12-Mediated Rejection of Tumors. *Science* 1997; 278:1623–1626.
30. Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y: Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. *J Immunol* 1997; 159:1418–1428.
31. Nakamatsu M, Yamamoto N, Hatta M, et al: Role of interferon- γ in V α 14+ natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumonia* infection in murine lungs. *Microbes Infect* 2007; 9:364-74.
32. Toyofuku A, Yasunami Y, Nabeyama K, et al: Natural Killer T-Cells Participate in Rejection of Islet Allografts in the Liver of Mice. *Diabetes* 2006; 55:34-39.
33. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, et al: Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *J Immunol* 2010; 184:3964–3977.
34. Goldberg MT, Han Y-P, Yan C, et al: TNF- α Suppresses α -Smooth Muscle Actin Expression in Human Dermal Fibroblasts: An Implication for Abnormal Wound Healing. *J Invest Dermatol* 2007; 127:2645–2655.
35. Gabbiani G: The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003; 200:500–503.
36. Ishikawa S, Ikejima K, Yamagata H, et al: CD1d-restricted natural killer T cells contribute to hepatic inflammation and fibrogenesis in mice. *J Hepatol* 2011; 54:1195–1204.
37. Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, et al: VEGF receptor signalling? in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:359–371.

38. Hijioka K, Sonoda K-H, Tsutsumi-Miyahara C, et al: Investigation of the role of CD1d-restricted invariant NKT cells in experimental choroidal neovascularization. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374:38–43.
39. Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P: TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* 2009; 19:116-27
40. Aoki M, Morishita R, Tabuyama Y, et al: Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infracted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis. *Gene Therapy* 2000; 7:417-27.
41. Wong CH, Jenne CN, Lee W-Y, et al: Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke. *Science* 2011; 334:101-5.
42. Gu X, Shen S, Huang C, et al: Effect of activated autologous monocytes/macrophages on wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; 102:53–59.
43. Ishida Y, Kondo T, Takayasu T, et al: The Essential Involvement of Cross-Talk between IFN- γ and TGF- β in the Skin Wound-Healing Process. *J Immunol* 2004; 172:1848–1855.
44. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, et al: Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Sci USA* 2008; 105:11287-92.
45. Takami Y, Motoki T, Yamamoto I, et al: Synergistic induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by the inflammatory cytokines interleukin-1 and interferon- γ . *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327:212-7.

46. Yamasaki E, Soma Y, Nakamura M, et al: Differential regulation of the secretion of vascular endothelial growth factor from human skin fibroblasts by growth factors and cytokines. *J Dermatol Sci* 2004; 36:118-21.
47. Cornelissen AMH, Maltha JC, Hoff JWV den, et al: Local Injection of IFN-gamma Reduces the Number of Myofibroblasts and the Collagen Content in Palatal Wounds. *J Dent Res* 2000; 79:1782–1788.
48. Hinz B: Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *J Invest Dermatol* 2007; 127:526–537.
49. Ulloa L, Doody J, Massagué J: Inhibition of transforming growth factor- β /SMAD signalling by the interferon- γ /STAT pathway. *Nature* 1999; 397:710–713.
50. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB: Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:101-17.
51. Sada-Ovalle I, Chiba A, Gonzales A, et al: Innate invariant NKT cells recognize *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages, produce interferon- γ , and kill intracellular bacteria. *PLoS Pathog* 2008; 4, e1000239.
52. Nieuwenhuis, E. E, Matsumoto T, Exley M, et al: CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nature Med* 2002; 8:588–593.
53. Wang H, Feng D, Park O, et al: Invariant NKT cell activation induces neutrophil accumulation and hepatitis: opposite regulation by IL-4 and IFN- γ . *Hepatology* 2013; 58:1474-85.
54. Crowe NY, Uldrich AP, Kyparissoudis K, et al: Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NKT cells. *J Immunol* 2003; 171:4020-7.

55. Cao Z, Yuan Y, Jeyabalan G, et al: Preactivation of NKT cells with alpha-GalCer protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mouse by a mechanism involving IL-13 and adenosine A2A receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297:249-58.
56. Launois P, Maillard I, Pingel S, et al: IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* 1997; 6:541-549.
57. Güler ML, Gorham JD, Hsieh CS, et al: Genetic susceptibility to *Leishmania*: IL-12 responsiveness in TH1 cell development. *Science* 1996; 271:981-987.
58. Kuroda E, Noguchi J, Doi T, et al: IL-3 is an important differentiation factor for the development of prostaglandin E2-producing macrophages between C57BL/6 and BALB/c mice. *Eur J Immunol* 2007; 37:2185–2195.
59. Benoit P, Sigounas VY, Thompson JL, et al: The role of CD1d-restricted NKT cells in the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung is dependent on the host genetic background. *Infect Immun* 2015; 83:2557-2567.
60. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, et al. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004; 4:231-237.
61. Sköld M, Faizunnessa NN, Wang CR, et al: CD1d-specific NK1.1+ T cells with a transgenic variant TCR. *J Immunol* 2000; 165:168-174.
62. Chen YH, Chiu NM, Mandal M, et al: Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 1997; 6:459-467.
63. Smiley ST, Kaplan MH, Grusby MJ: Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science* 1997; 275:977-979.

64. Porubsky S, Speak AO, Luckow B, et al: Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:5977-5982.
65. Jahng A, Maricic I, Aguilera C, et al: Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med* 2004; 199:947-957.
66. Dirk M. Zajonc, Igor Maricic, Douglass Wu, et al: Structural basis for CD1d presentation of a sulfatide derived from myelin and its implications for autoimmunity. *J Exp Med* 2005; 202:1517-1526.
67. Kronenberg M, Kinjo Y: Infection, autoimmunity, and glycolipids: T cells detect microbes through self-recognition. *Immunity* 2005; 22:657-659.
68. Nagarajan NA, Kronenberg M: Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 2007; 178:2706-2713.
69. Matsuoka N, Itoh T, Watarai H, et al: High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *J Clin Invest* 2010; 120:735-43.
70. Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, et al: High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing. *J Invest Dermatol* 2008; 128:1545-53.
71. Halder RC, Aguilera C, Maricic I, et al: Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease. *J Clin Invest* 2007; 117:2302-2312.
72. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, et al: Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS One* 2012; 7:e30568.

X. 図の説明

図 1. 本研究と Schneider らの研究との相違点および創部破断強度摘出法

(A) 本研究と Schneider らの研究との相違点、実施する項目を示す。(B) 創部破断強度を測定する際のサンプル作成法を模式図として示す。

図 2. 創部への NKT 細胞集積

創部から白血球を採取し、NKT 細胞数を各タイムポイントで解析した。(A)正常皮膚組織(unwounded)と創作成 3 日後のドットプロットを示す。(B)創部に集積した NKT 細胞数を示す。NKT 細胞は NK1.1 陽性 CD3 陽性細胞とした(n=5)。*, $p < 0.05$ 。
(unwounded と比較)

図 3. J α 18 遺伝子欠損の創傷治癒への影響

WT マウスおよび J α 18KO マウスの背部に全層欠損層を作成し、(A)肉眼所見、(B)創閉鎖率を創作成 3、5、7、10 日目に解析した(n=18-24)。(C)創作成 5、7 日目の皮膚病理像を示す。(D)肉芽の厚さ、(E)再上皮化率の創作成後の経時的変化を示す(n=9)。結果は平均(mean) \pm 標準偏差(SD)で表している。*, $p < 0.05$ 。▲;創端部、↑;表皮伸展部、↓肉芽の厚さ

図 4. J α 18 遺伝子欠損のコラーゲン合成、筋線維芽細胞分化、血管新生への影響

(A)創作成 3 日目に創部から総 RNA を抽出し、COL1A1 mRNA を Real-time PCR 法を用いて解析した(n=6)。(B)創部ハイドロキシプロリン量を創作成 3、5、7、10 日目

に解析した(n=6)。(C)創部破断強度を創作成 7、10 日目に測定した(n=18)。(D)創作成 3 日目の α -SMA の免疫組織染色、陽性細胞数を示す(n=9)。↑; α -SMA 陽性細胞 (E)創作成 3 日目の CD31 の免疫組織染色、陽性細胞数を示す(n=9)。↑;CD31 陽性細胞
結果は平均(mean) \pm 標準偏差(SD)で表している。*, $p < 0.05$ 。

図 5. J α 18 遺伝子欠損の TGF- β 1、VEGF 産生への影響

(A)正常皮膚組織、創作成 1、2、3 日目の創部ホモジネート上清中 TGF- β 1 産生量を測定した(n=5)。正常皮膚組織、創作成 1、2、3 日目の創部ホモジネート上清中 VEGF 産生量を測定した(n=5)。結果は平均(mean) \pm 標準偏差(SD)で表している。*, $p < 0.05$ 。

図 6. LMNC 移入の創傷治癒への影響

J α 18KO マウスに創作成 1 日前に WT マウスか J α 18KO マウス由来の LMNC(1×10^6 /mouse)を細胞移入した。(A)創閉鎖率(n=18)、(B) α -SMA 陽性細胞数(n=9)、(C)CD31 陽性細胞数(n=9)を創作成 3 日目に解析した。結果は平均(mean) \pm 標準偏差(SD)で表している。*, $p < 0.05$ 。

図 7. J α 18 遺伝子欠損の IFN- γ 産生への影響および NKT 細胞由来の IFN- γ が創傷治癒過程に及ぼす影響

(A)WT マウスと J α 18KO マウスの創作成後の IFN- γ mRNA 発現を Real-time PCR 法を用いて解析した(n=6)。(B)創作成 3 日目の J α 18KO マウスにおける創部 NK 細胞、T 細胞、好中球細胞内 IFN- γ 産生を示す。カットオフラインは抗 IFN- γ 抗体のアイソタイプコントロールを基準に決定した。次に、J α 18KO マウスに創作成 1 日前に WT マウスか IFN- γ KO マウス由来の LMNC(1×10^6 /mouse)を細胞移入した。(C) 創閉鎖率

(n=18)、**(D)** α -SMA 陽性細胞数(n=9)、**(E)**CD31 陽性細胞数(n=9)を創作成 3 日目に解析した。結果は平均(mean) \pm 標準偏差(SD)で表している。*, $p < 0.05$ 。

図 8. α -GalCer 投与が創傷治癒過程に与える影響

WT マウスに創作成 1 日前に α -GalCer(2 μ g/ mouse)か 0.2%DMSO を腹腔内投与し、創傷治癒過程を検討した。**(A)**創作成 3、5 日目の創閉鎖率(n=18)、**(B)**創作成 3 日目の創部ハイドロキシプロリン量(n=18)を測定した。**(C)**創作成 1、2、3 日目の創部ホモジネート上清中 TGF- β 1 産生量を ELISA 法で測定した(n=5)。**(D)** α -SMA 陽性細胞数、**(E)**CD31 陽性細胞数(n=9)を創作成 3 日目に解析した。**(F)**創作成 1、2、3 日目の創部ホモジネート上清中 VEGF 産生量を ELISA 法で測定した(n=5)。**(G)**創部 IFN- γ mRNA 発現を Real-time PCR 法で解析した(n=6)。**(H)**WT マウスと IFN- γ KO マウスに α -GalCer(2 μ g/ mouse)か 0.2%DMSO を腹腔内投与し、創作成 3 日目の創閉鎖率を算出した(n=18)。結果は平均(mean) \pm 標準偏差(SD)で表している。*, $p < 0.05$ 。

図 9. 創傷治癒過程における NKT 細胞の影響に関する模式図

本研究で得られた結果 (赤字) および Barrientos⁴⁾、Lucas³¹⁾らの報告 (黒字) をもとに、創傷治癒過程における iNKT 細胞の影響を模式的に示した。受傷後、NKT 細胞が創部に集積し、IFN- γ を産生することで、マクロファージを活性化させる。増殖期にはマクロファージや線維芽細胞から TGF- β が産生され、線維芽細胞を筋線維芽細胞に分化させる。さらに、VEGF 産生の増加に伴い、血管新生が促進する。再構築期ではコラーゲン合成促進により、肉芽組織が形成され、創閉鎖、再上皮化が起こり治癒へと至る。

図1

A

	本研究	Schneiderらの研究
マウス	C57BL/6	BALB/c
創部の環境	閉鎖創	開放創
IFN- γ	実施	未実施
IL-4	実施	未実施
α -GalCer投与	実施	未実施

B

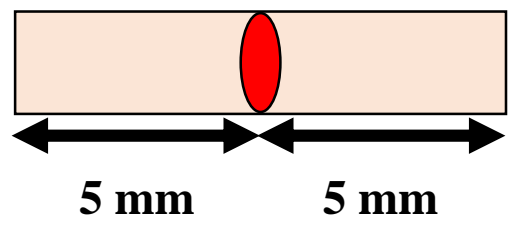


図2

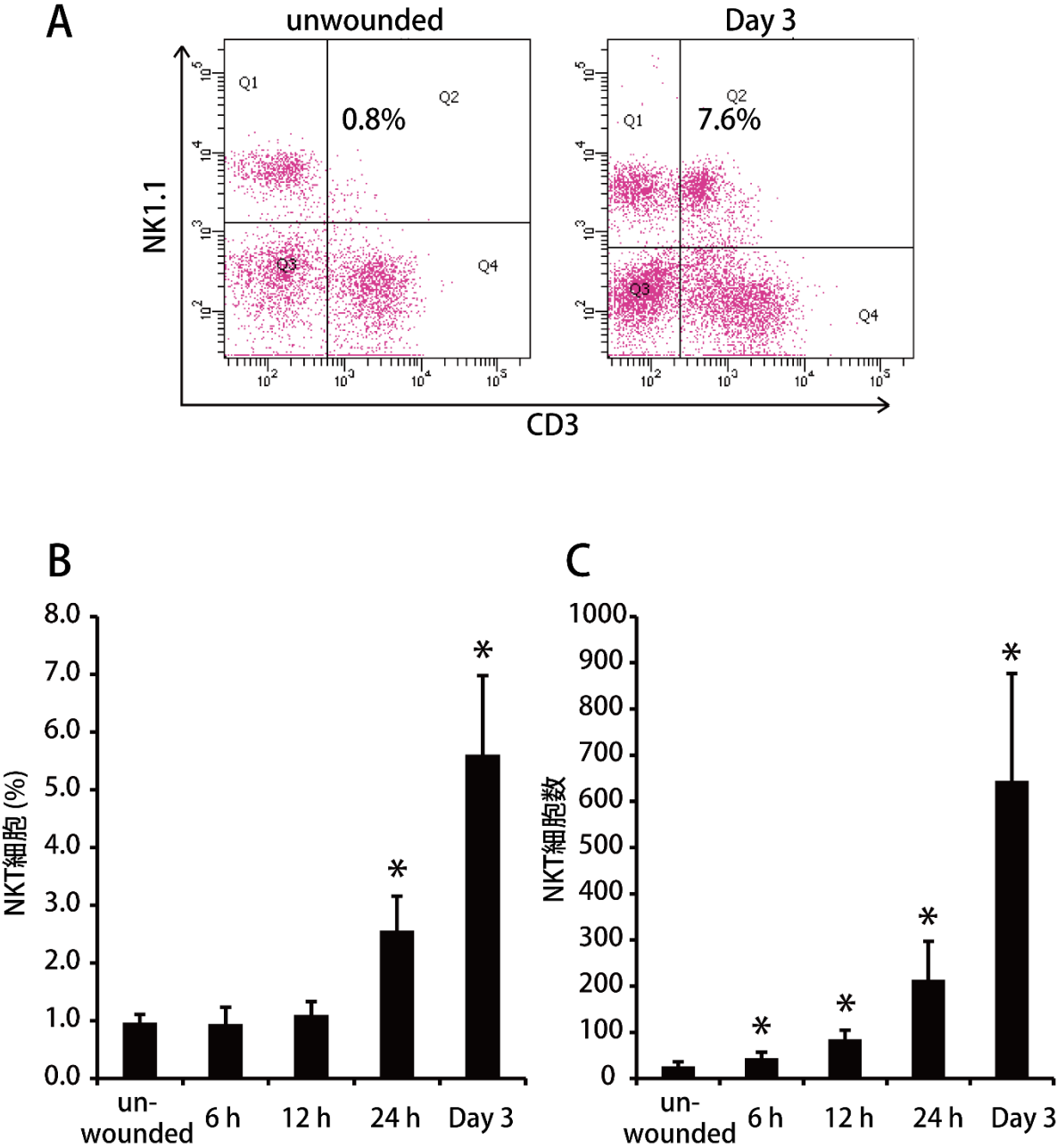


図3

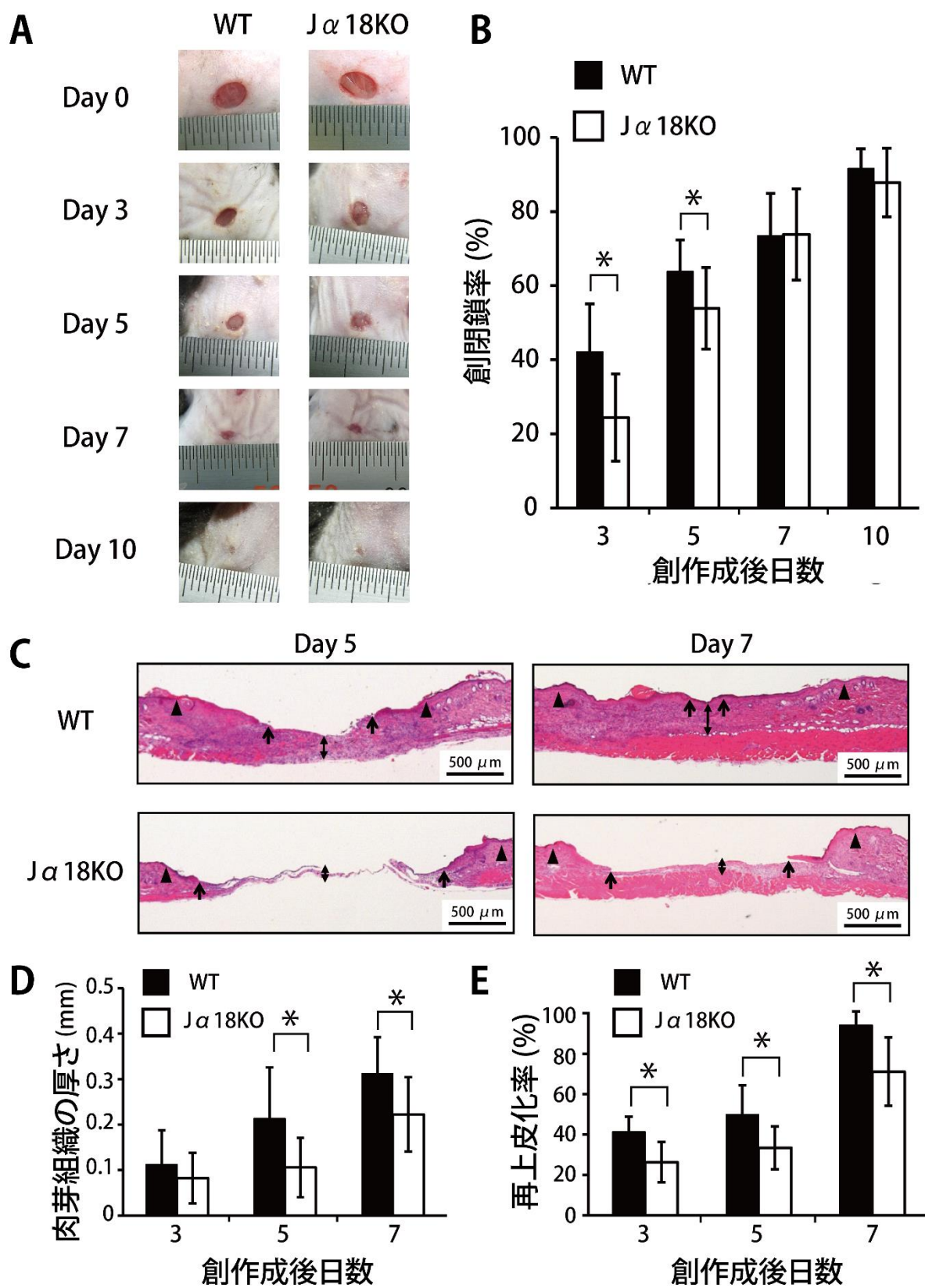


図4

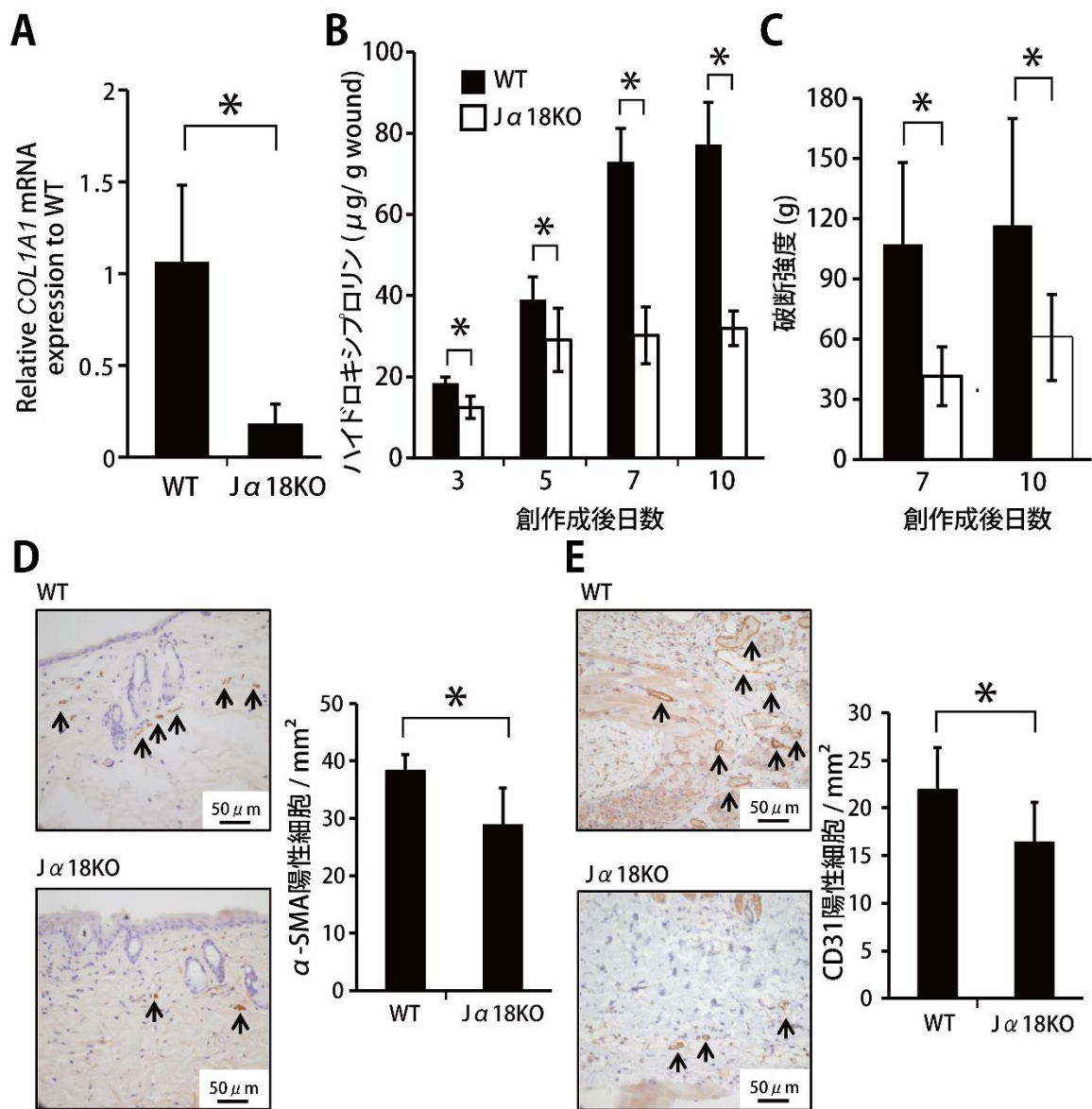


図5

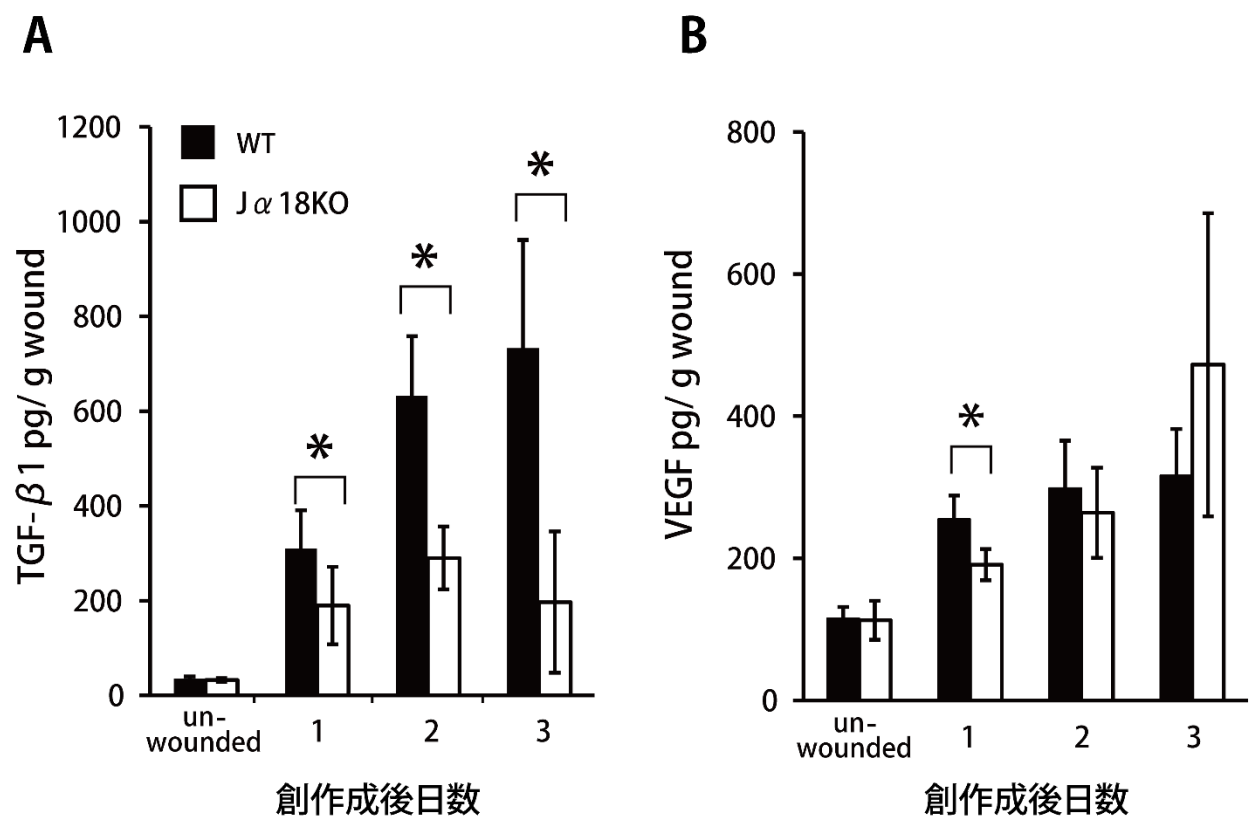


図6

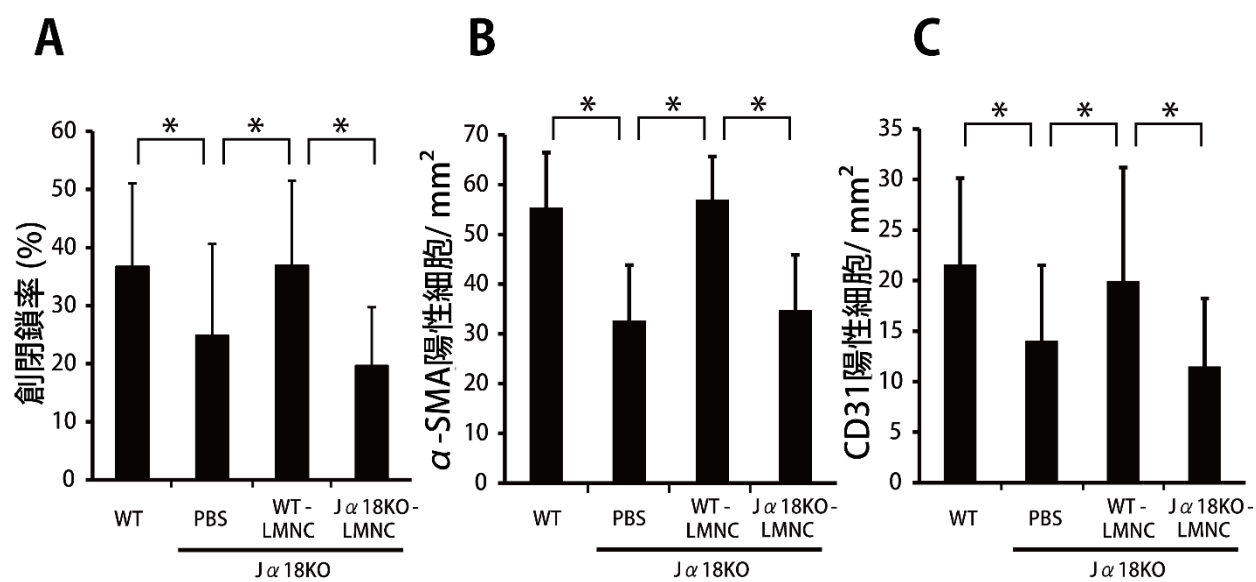


图7

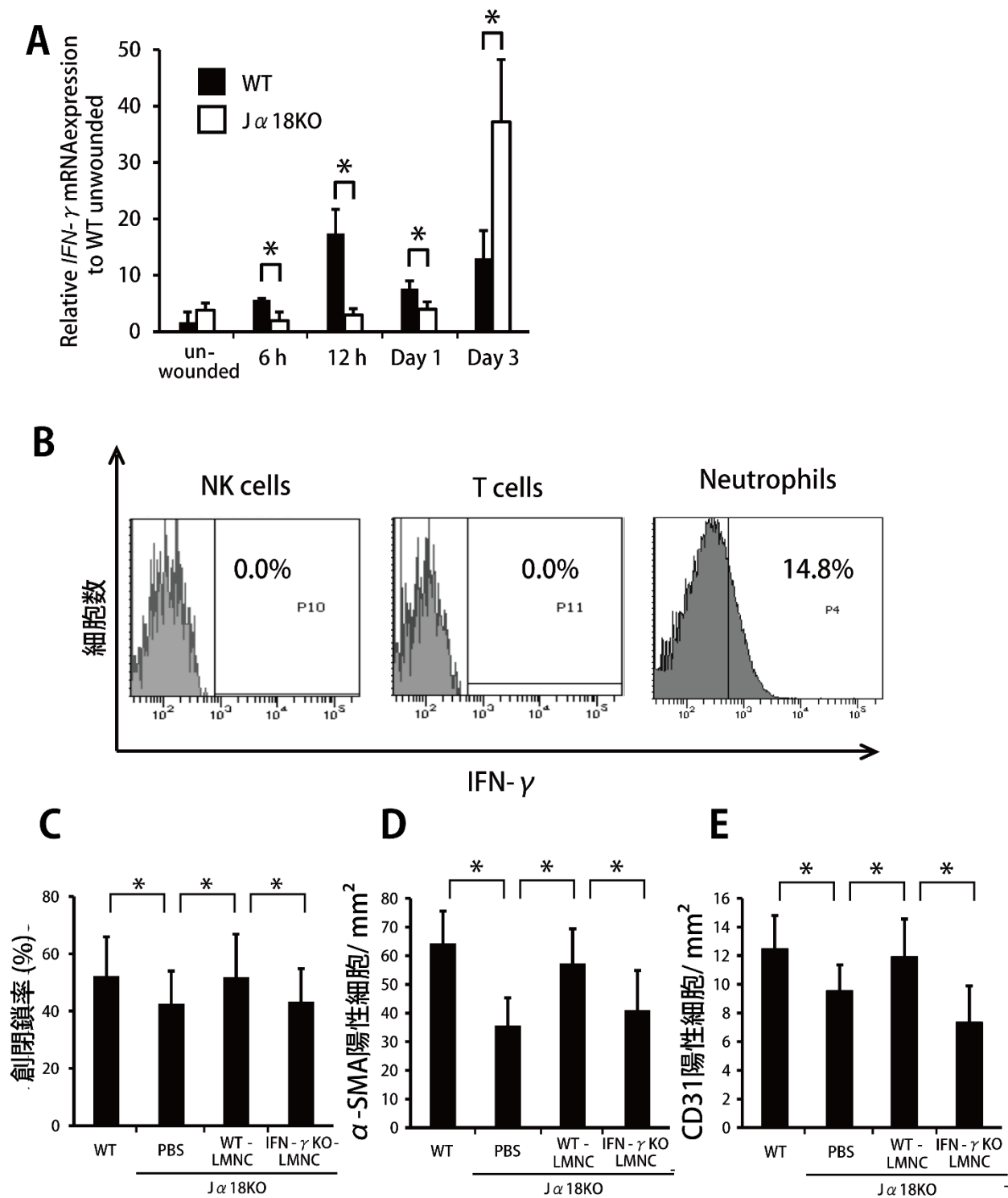


図8

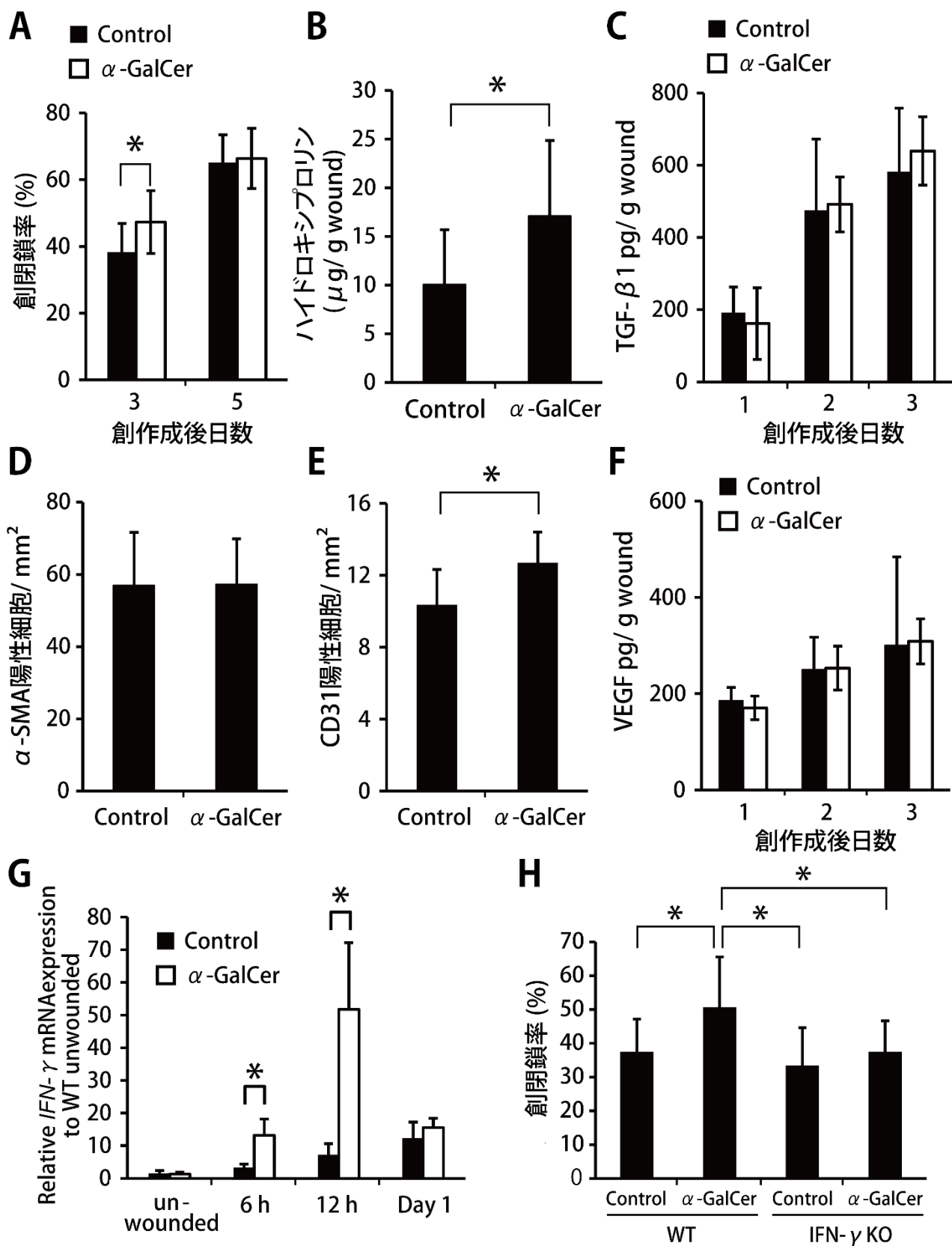


図9

